

PHƯƠNG PHÁP KHẢO SÁT PHAGE

PGS.TS. Biền Văn Minh

Trường ĐHSP – Đại học Huế

Phage là một loại virus đặc biệt, tên gọi tắt của Bacteriophage hay còn được gọi là thể thực khuẩn. Đây là nhóm virus phân bố rộng rãi trong tự nhiên, lần đầu tiên được nhà khoa học người Anh Frederick Twort (1877-1950) phát hiện ở tự cầu năm 1915, sau đó là ông Felix d'Hérelle (1873-1949), nhà khoa học Canada đã xác định được virus ký sinh trên vi khuẩn lỵ và gọi chúng là Bacteriophage. Phage không gây bệnh cho người mà chỉ gây bệnh cho vi khuẩn. Mỗi vi khuẩn có thể là vật chủ của một hoặc nhiều phage. Hiện nay phage được sử dụng để nghiên cứu định loại prokaryote (sinh vật nhân sơ), vận chuyển các yếu tố di truyền trong nghiên cứu sinh học phân tử, điều trị các bệnh do vi khuẩn, điều tra dịch tễ học... Trong bài viết này chúng tôi giới thiệu phương pháp khảo sát phage.

1. Sơ lược về phage

a. Cấu trúc của phage

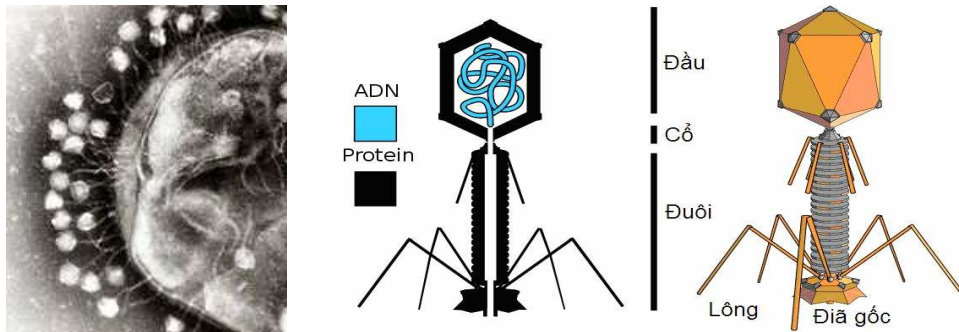
- Cấu trúc: phage có 3 dạng cơ bản: cấu trúc hình khối không đuôi, cấu trúc hình khối có đuôi và cấu trúc dạng sợi hay dạng que. Dạng có đuôi (chẳng hạn phage T2) gồm đầu hình lục giác; cổ; đuôi có dạng hình trụ, cuối đôi có các sợi lông như chân để bám vào vi khuẩn và đĩa gốc với 6 sợi lông đuôi.

- Thành phần hóa học gồm:

+ ADN: có hầu hết ở các phage, thường có 2 chuỗi xoắn vào nhau, một số có ADN một chuỗi, những phage không chứa ADN thì chứa ARN và thường ARN một chuỗi.

+ Protein: vỏ capsid được cấu tạo bằng những đơn phân gọi là capsome chính là những hạt protein.

+ Enzyme: ở đuôi của phage có chứa một số loại enzyme.



Hình 1. Ảnh hiển vi điện tử các phage bám trên bề mặt tế bào vi khuẩn (trái);

hình mặt cắt (giữa) và hình dạng ngoài phage T2

- *Phage độc lực*: phage sau khi nhân lên trong vi khuẩn thì vi khuẩn sẽ chết và phage mới hình thành.

- *Phage ôn hòa*: sau khi xâm nhập vào tế bào vi khuẩn sẽ xảy ra một trong hai trường hợp:

+ Theo cách nhân lên của phage độc lực và giết chết tế bào vi khuẩn.

+ Các ADN của phage sẽ kết hợp với ADN của vi khuẩn cho nên không có quá trình nhân lên. Khi vi khuẩn nhân lên thì các ADN của phage nhân lên theo.

c. Sự nhân lên của phage độc lực trong vi khuẩn

Sự nhân lên của phage độc lực trong vi khuẩn thường diễn ra theo các giai đoạn sau:

- *Giai đoạn hấp phụ và xâm nhập*: Muốn xâm nhập và nhân lên trong vi khuẩn, trước hết phage phải tìm thấy chỗ tiếp nhận đặc hiệu trên bề mặt tế bào vi khuẩn. Nhiều nghiên cứu cho thấy khi vi khuẩn biến dị, thay đổi tính chất bề mặt thì phage không có khả năng xâm nhập vào vi khuẩn. Khi đã bám vào bề mặt tế bào vi khuẩn, men ở đuôi của phage sẽ làm tan vách (thành)

tế bào vi khuẩn, sau đó đuôi co bóp đẩy lõi của đuôi vào vi khuẩn, tiếp theo ADN của phage sẽ được bơm vào tế bào vi khuẩn. Vỏ capsid sẽ ở lại ngoài vi khuẩn.

- *Giai đoạn sinh tổng hợp các thành phần*: Sau 2 - 3 phút, enzyme deoxyribonuclease của phage xuất hiện phá hủy ADN của tế bào vi khuẩn, mARN và kèm theo hàng loạt enzym cần thiết cho phage được tổng hợp. ADN của phage được hình thành cùng với protein (tạo vỏ capsid) của phage được tổng hợp ở ribosome của tế bào chủ.

- *Giai đoạn lắp ghép và giải phóng*: Các thành phần ADN lắp ghép với protein tạo thành phage. Các phage mới được hình thành sau thời gian khoảng 12 phút và sự giải phóng phage mới thường xảy ra ở phút thứ 25. Trung bình mỗi vi khuẩn có thể giải phóng từ 100 đến vài trăm phage.

d. Tính tiềm tan và phage lamda (λ)

Tính tiềm tan lần đầu tiên được phát hiện ở vi khuẩn *E. coli* K12/phage λ .

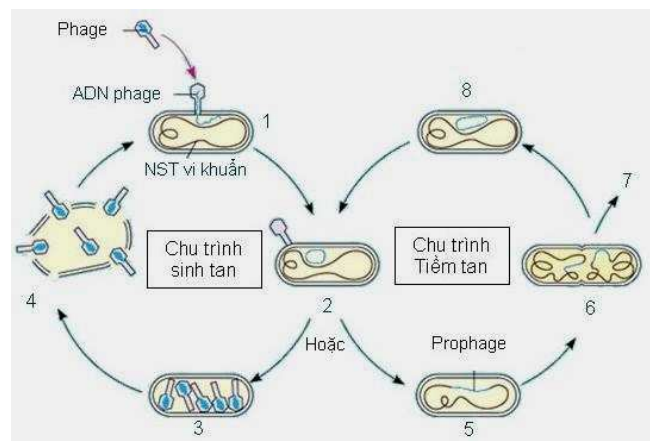
Sau khi phage λ xâm nhập vào tế bào vi khuẩn chủ (*E. coli* K12), chúng gắn phân tử ADN vào NST của vi khuẩn và tiến hành sao chép như một phần của NST vi khuẩn. Các hạt phage không được tạo thành. Phân tử ADN của phage khi gắn vào bộ gen của vi khuẩn được gọi là prophage. Tế bào vi khuẩn mang prophage được gọi là tế bào tiềm tan (lysogen). Khi có tác nhân gây đột biến (ví dụ như tia UV) tác động vào prophage, lập tức chúng chuyển sang dạng gây độc và thực hiện chu trình sinh tan. Mỗi quan hệ này được hiểu theo sơ đồ sau:

- *Chu trình tan*:

- 1) Phage tấn công tế bào chủ và bơm ADN vào
- 2) Tái tạo vòng ADN phage
- 3) ADN và protein của phage được tổng hợp và lắp ghép tạo thành phage mới
- 4) Tế bào bị phân giải, giải phóng phage

- *Chu trình tiềm tan*:

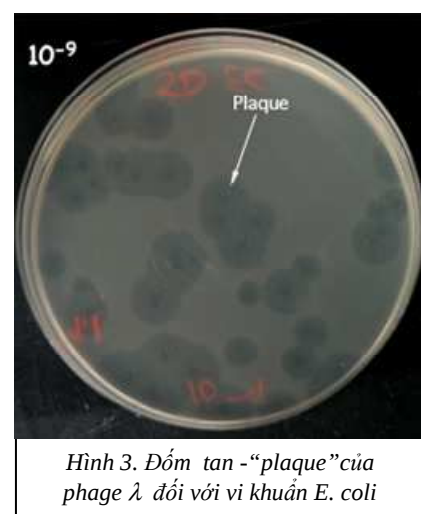
- 5) ADN của phage tích hợp vào NST vi khuẩn tạo thành dạng prophage
- 6) Tế bào vi khuẩn phân chia bình thường, sao chép prophage và truyền cho thế hệ sau
- 7) Nhiều tế bào phân chia tạo ra khuẩn lạc vi khuẩn có chứa prophage
- 8) Một số prophage tồn tại trên NST vi khuẩn khởi đầu cho chu trình sinh tan mới.



Hình 2. Chu trình tan và tiềm tan ở phage λ

2. Phương pháp khảo sát phage

a. *Sự hình thành đốm tan* - "plaque": phage chỉ nhân lên ở tế bào vi khuẩn sống nhạy cảm. Vì kích thước không cho phép quan sát trực tiếp nếu không có kính hiển vi điện tử nên chúng ta chỉ theo dõi hoạt động của chúng bằng phương tiện gián tiếp. Thông thường, người ta cho một hạt phage vào một lớp vi khuẩn đang phân chia ở trên đĩa thạch dinh dưỡng sẽ tạo nên một vùng phân giải sáng mờ đục của vi khuẩn đang phát triển (xem hình 3). Vùng phân giải này gọi là một vết tan hay còn gọi là đốm tan - "plaque"; nó được tạo thành do tế bào vi khuẩn bị nhiễm phage phân giải và phóng thích nhiều hạt phage mới, những phage này liên xâm nhiễm những tế bào vi khuẩn kế cận. Quá trình này lặp lại tuần tự cho đến khi sự phát triển của vi khuẩn ở trên đĩa thạch ngừng lại do hết thức ăn và tích tụ phẩm vật độc. Nếu thao tác khéo léo, mỗi hạt phage tạo nên một plaque. Mọi vật liệu chứa phage



Hình 3. Đốm tan - "plaque" của phage λ đối với vi khuẩn *E. coli*

có thể định lượng như thế bằng cách pha loãng thích hợp và cho vào đĩa thạch dinh dưỡng mọc dày đặc vi khuẩn nhạy cảm. Đếm plaque cũng tương tự như đếm khuẩn lạc trong định lượng vi khuẩn.

b. Phân lập và tinh chế: để khảo sát những tính chất vật lý và hóa học của phage cần phải điều chế một lượng đầy đủ phage tinh chế không chứa vật liệu tế bào. Thông thường, người dùng môi trường lỏng nuôi cấy vi khuẩn vật chủ được tiếp chủng phage và ủ cho đến khi môi trường nuôi cấy chứa các vi khuẩn mẩn cảm hoàn toàn ly giải. Lúc này dịch thủy phân chỉ chứa hạt phage và mảnh vụn vi khuẩn, chúng được tách riêng bằng li tâm phân biệt. Phần phage li tâm có thể sử dụng để khảo sát những tính chất vật lý và hóa học hoặc soi kính hiển vi điện tử.

3. Ứng dụng của phage

a. Ứng dụng trong nghiên cứu sinh học phân tử: nhiều phage được dùng làm phương tiện vận chuyển gen trong nghiên cứu sinh học phân tử và di truyền vi khuẩn. Sự chuyển nạp là quá trình vận chuyển gen ở vi khuẩn qua trung gian của phage. Một vài chủng phage ví dụ phage P₂₂ có thể vận chuyển bất cứ gen nào của vi khuẩn, đó là sự chuyển nạp tổng quát. Trong sự chuyển nạp đặc hiệu, một số phage đặc hiệu ví dụ phage λ (lambda) chỉ vận chuyển một số gen của vi khuẩn cho sang vi khuẩn nhận.

b. Ứng dụng trong chẩn đoán vi khuẩn và dịch tễ học: phage được sử dụng để định type phage ở vi khuẩn. Mỗi loài vi khuẩn có thể gồm nhiều type phage khác nhau do bản chất của thụ thể ở vi khuẩn đối với các phage khác nhau. Người ta đã chọn được một số bộ phage. Trong mỗi bộ phage mỗi phage chỉ làm phân giải một type phage của một loài vi khuẩn. Việc định type phage có giá trị về chẩn đoán vi khuẩn và nhất là về dịch tễ học.

Phage ôn hòa β có thể tích hợp vào nhiễm sắc thể vi khuẩn bạch hầu và chỉ ở trạng thái sinh tan vi khuẩn bạch hầu mới tạo thành độc tố.

c. Ứng dụng khác: hiện nay có nhiều hãng công nghệ sinh học trên thế giới đang ra sức chạy đua để sớm đưa ra thị trường những loại chế phẩm sử dụng phage. Nhiều công ty dược phẩm của Mỹ, Ấn Độ... đang nghiên cứu phage để điều trị nhiều căn bệnh vi khuẩn như: lao, vi khuẩn gây nhiễm độc thức ăn, cùng những vũ khí sinh học, trong đó có bệnh than...

*Câu hỏi:

a. Hãy trả lời đúng hoặc sai các câu hỏi sau: 1) Phage là một loại virus, 2) Phage thường gây bệnh cho người và động vật, 3) Phage phát triển theo cấp số nhân, 4) Phage có thể nhân lên ở bất kỳ tế bào vi khuẩn nào mà chúng gặp, 5) Dùng phage để định loại prokaryote là ứng dụng thường dùng trong điều tra dịch tễ học, 6) Để khảo sát phage phải dùng kỹ thuật “plaque”.

b. Hãy dùng từ hoặc cụm từ thích hợp điền vào các câu sau: 1) Thành phần hóa học của phage gồm:....., 2) Axit nucleic của phage chủ yếu là:....., 3) Muốn xâm nhập và nhân lên trong tế bào vi khuẩn, phage phải tìm thấy.....trên tế bào vi khuẩn. 4) Đốm tan - “plaque”; nó được tạo thành do tế bào vi khuẩn bị nhiễm phage

4. Kết luận: Loại virus chỉ chuyên tấn công và cuối cùng làm chết vi khuẩn, đó là phage hay còn gọi là thực khuẩn thể. Loại virus rất độc đáo này không gây hại cho người. Để khảo sát phage có nhiều phương pháp, song đơn giản nhất là sử dụng kỹ thuật “plaque”. Việc nghiên cứu phage đang mở ra rất nhiều tiềm năng và triển vọng ứng dụng trong đời sống như chữa bệnh, bảo quản thực phẩm, làm sạch nguồn nước nhiễm khuẩn, để định loại các vi khuẩn gây bệnh, điều tra dịch tễ học...□

Tài liệu tham khảo

1. Biên Văn Minh (chủ biên), 2006. Vi sinh vật học, NXB ĐHHuế.
2. Hoàng Trọng Phán (chủ biên), 2008. Di truyền học VSV và ứng dụng. NXB ĐH Huế.
3. <http://vi.wikipedia.org/wiki/...>